·实验研究·

# 基于CNA35靶向液态氟碳纳米粒的超声分子成像检测糖尿病肾病大鼠肾脏纤维化的实验研究

冯钰瑾 杨晓云 赵 昆 刘 芬 宗美男 王 一

**摘 要 目的** 制备一种由胶原结合蛋白35(CNA35)介导的靶向液态氟碳纳米粒(PFP-NPs),探讨其在超声分子成像检测糖尿病肾病(DN)大鼠肾脏纤维化中的应用价值。**方法** 制备经荧光标记的非靶向PFP-NPs和CNA35靶向PFP-NPs,经转化生长因子-β诱导人肾小管上皮HK-2细胞间质转化,发生胶原沉积,然后分别将非靶向PFP-NPs和CNA35靶向PFP-NPs与细胞共同孵育,于倒置荧光显微镜下观察细胞上PFP-NPs荧光信号。建立DN大鼠模型,分为非靶向组和靶向组,每组各10只,分别静脉注射非靶向PFP-NPs与CNA35靶向PFP-NPs,应用超声分子成像检测两组DN大鼠静脉注射PFP-NPs后10 min、30 min肾脏超声分子成像信号强度;然后处死DN大鼠并取肾脏组织,检测肾脏组织PFP-NPs荧光信号强度及Ⅰ型胶原荧光信号强度;免疫组织化学检测肾脏组织Ⅰ型胶原染色面积占比,分析肾脏超声分子成像信号强度与Ⅰ型胶原染色面积占比的相关性。**结果** CNA35靶向PFP-NPs孵育的人肾小管上皮HK-2细胞上的荧光信号强度高于非靶向PFP-NPs孵育的细胞(388.21±15.28 vs. 25.79±3.62),差异有统计学意义($P$<0.05)。靶向组DN大鼠肾脏组织PFP-NPs荧光信号强度高于非靶向组(946.02±83.55 vs. 73.69±21.72),差异有统计学意义($P$<0.05);靶向组Ⅰ型胶原荧光信号强度与非靶向组比较差异无统计学意义(969.07±96.67 vs. 943.39±106.18),且CNA35靶向PFP-NPs荧光信号与Ⅰ型胶原荧光信号区域重合。体内超声分子成像显示,靶向组DN大鼠静脉注射PFP-NPs后10 min、30 min肾脏组织超声分子成像信号强度均高于非靶向组(8.37±1.27 vs. 1.92±0.25、9.73±1.25 vs. 2.08±1.32),差异均有统计学意义(均$P$<0.05)。相关性分析显示,DN大鼠肾脏超声分子成像信号强度与Ⅰ型胶原染色面积占比呈正相关($r$=0.838,$P$<0.001)。**结论** 成功制备了CNA35靶向PFP-NPs,其能够靶向结合大鼠肾脏胶原高表达部位,实现了对DN大鼠肾脏纤维化的靶向超声分子成像。

**关键词** 超声分子成像;CNA35;液态氟碳纳米粒,靶向;肾纤维化;糖尿病肾病;大鼠

[中图法分类号]R445.1;R587.1 [文献标识码]A

# Experimental study of CNA35-targeted fluorocarbon nanoparticles-based ultrasound molecular imaging for the detection of renal fibrosis in rats with diabetic nephropathy

FENG Yujin, YANG Xiaoyun, ZHAO Kun, LIU Fen, ZONG Meinan, WANG Yi

Department of Abdominal Ultrasound, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

**ABSTRACT Objective** To prepare targeted fluorocarbon nanoparticles (PFP-NPs) labeled with the collagen marker CNA35, and to explore application value for ultrasound molecular imaging in detecting renal fibrosis in rats with diabetic nephropathy (DN). **Methods** Non-targeted PFP-NPs and CNA35-targeted PFP-NPs labeled with fluorescent markers were prepared. The induction of human renal tubular epithelial cell HK-2 mesenchymal transformation and collagen deposition were mediated by transforming growth factor-β. The non-targeted PFP-NPs and targeted PFP-NPs were subsequently co-incubated with cells, followed by observation of the cellular fluorescence signal using a fluorescence microscope. The DN rats model were established and divided into a non-targeted group and a targeted group, 10 rats in each group. The non-targeted PFP-NPs and CNA35-targeted PFP-NPs were intravenously administered to the two groups, respectively. Ultrasound molecular imaging was

基金项目:2022年河北省自然科学基金精准医学联合基金培育项目(H2022206202)

作者单位:050000 石家庄市,河北医科大学第二医院腹部超声科(冯钰瑾、杨晓云、刘芬、宗美男、王一),重症医学科(赵昆)

通讯作者:王一,Email:Wangyi_81@163.com

used to detect the signal intensity of renal ultrasound molecular imaging in DN rats in two groups at 10 min and 30 min after intravenous administration. The DN rats were put to death, then the kidney tissues were collected for detecting the fluorescence signals emitted by PFP-NPs and type Ⅰ collagen. The expression and percentage of staining area for type Ⅰ collagen in renal tissue were analyzed by immunohistochemistry, and the correlation between the signal intensity of renal ultrasound molecular imaging and the distribution percentage of type Ⅰ collagen was analyzed. **Results** The fluorescence signal intensity of human renal tubular epithelial HK-2 cells incubated with CNA35-targeted PFP-NPs was higher than that of cells incubated with non-targeted PFP-NPs (388.21±15.28 vs. 25.79±3.62), with a statistically significant difference ($P$<0.05). The fluorescence signal intensity of PFP-NPs in the renal tissue of DN rats in the targeted group was higher than that of non-targeted group (946.02±83.55 vs. 73.69±21.72), with a statistically significant difference ($P$<0.05). There was no significant difference of fluorescence signal intensity of type Ⅰ collagen between the targeted group and the non-targeted group (969.07±96.67 vs. 943.39±106.18). The in vivo ultrasound molecular imaging demonstrated that the signal intensity of renal ultrasound molecular imaging of DN rats in the targeted group was higher than that of the non-targeted group at both 10 min and 30 min after intravenous administration (8.37±1.27 vs. 9.73±1.25, 1.92±0.25 vs. 2.08±1.32), with statistically significant differences (both $P$<0.05). Correlation analysis showed a positive correlation between the signal intensity of renal ultrasound molecular imaging and the distribution percentage of type Ⅰ collagen ($r$=0.838, $P$<0.001). **Conclusion** CNA35-targeted PFP-NPs were successfully prepared and demonstrated specific binding to collagen-enriched renal regions, enabling targeted ultrasound molecular imaging of renal fibrosis in DN rats.

**KEY WORDS** Ultrasound molecular imaging; CNA35; Fluorocarbon nanoparticles, targeted; Renal fibrosis; Diabetic nephropathy; Rats

糖尿病肾病（diabetic nephropathy，DN）是糖尿病最常见的晚期微血管并发症之一，透析治疗的DN患者5年生存率仅约50%，早期检出率低、干预不及时是导致DN患者高死亡率的主要原因之一[1]。肾脏纤维化是DN的主要病理表现，也是识别早期DN的关键[1-2]。肾穿刺活检是目前临床诊断DN的金标准，但其为有创操作，可能引起腰痛、血尿、肾周血肿等并发症。超声分子成像是在超声造影和分子标记基础上发展起来的一种新兴检查手段，其原理是将特定的分子探针结合在液态氟碳纳米粒（fluorocarbon nanoparticles，PFP-NPs）上，从而获得靶向特定抗原或抗体的能力，然后将其通过静脉注入体内，分子探针会靶向结合其配体，继而使PFP-NPs在分子探针高表达区域累积，PFP-NPs在低强度聚焦超声的诱导下转化为微米级微泡，再通过超声进行检测[3-4]，其具有靶向性好、能实时显示病变结构等优势，为组织定性和定量检测提供了一种无创、实时的新型成像技术，具有极好的临床应用前景。超声分子成像的关键在于分子探针的选择。近期研究[5-6]发现了一种可与Ⅰ型胶原特异性结合的新型分子探针——胶原结合蛋白35（CNA35），可用于Ⅰ型胶原的标记。本实验通过探讨CNA35靶向PFP-NPs在超声分子成像检测DN大鼠肾脏纤维化中的应用价值，旨在为临床DN诊断提供理论依据。

## 材料与方法

一、主要实验材料及仪器

1. 主要材料：二棕榈酰磷脂酰胆碱（DPPC）、二硬脂酰磷脂酰甘油钠盐（DSPG）、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺（DSPE）、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-氨基（DSPE-PEG2000-$NH_2$）、3-二甲氨基丙基-3-乙基碳二亚胺盐酸盐（EDC）、N-羟基丁二酰亚胺（NHS）、胆固醇（CH）均购于德国Merck公司；细胞膜红色荧光探针（DiI）购于美国MCE公司；全氟正戊烷（PFP）、2-吗啉乙磺酸（2-MES）、PBST缓冲液均购于阿拉丁控股集团有限公司；含10%胎牛血清的DMEM培养基购于赛默飞世尔科技（中国）有限公司；转化生长因子-β（TGF-β）、HRP标记二抗、DAB染色试剂盒均购于英国Abcam公司；DAPI染色液、链脲佐菌素（STZ）均购于德国Sigma公司；FITC标记的抗大鼠Ⅰ型胶原蛋白抗体购于美国Arigo公司。

2. 主要仪器：旋转蒸发仪（BK-RE-1A，济南程腾生物技术有限公司）；超声波处理器（FS-150N，上海生析超声仪器有限公司）；倒置荧光显微镜（DMIL，德国徕卡公司）；低强度聚焦超声仪（重庆医科大学超声影像学研究所）；正置显微镜（Axioscope 5，德国蔡司公司）；超声成像系统[东芝Aplio 500，上海电气（集团）公司]。

二、主要实验方法

（一）CNA35靶向PFP-NPs的制备及相关检测

1.CNA35靶向PFP-NPs的制备：分别称取10 mg DPPC、4 mg DSPG、3 mg DSPE-PEG2000-$NH_2$或DSPE、3 mg CH溶解于10 ml三氯甲烷中，然后再加入100 ml DiI；使用旋转蒸发仪在50℃条件下真空旋转蒸发1 h，除去有机溶剂。加入4 ml PBS缓冲液，在冰水浴（0~4℃）条件下，使用超声波处理器声振乳化，得到半透明的混悬液，加入液态PFP后，再次使用超声波处理器声振乳化，12 000 g离心3次取沉淀，将其加入2-MES溶液（pH值为8.0）中混匀即得带有荧光标记的非靶向PFP-NPs混悬液。另取4 mg EDC、3 mg NHS溶于1 ml 2-MES溶液（pH值为5.2）中，加入50 ml CNA35，冰浴（0℃）条件下置于摇床孵育1 h，然后调节溶液pH值至8.0，即为CNA35溶液。取500 ml上述制备好的带有荧光标记的非靶向PFP-NPs混悬液，加入CNA35溶液，4℃避光孵育过夜，即得带有荧光标记的CNA35靶向PFP-NPs混悬液。将上述带有荧光标记的非靶向PFP-NPs混悬液和带有荧光标记的CNA35靶向PFP-NPs混悬液于4℃离心取沉淀，即制得带有荧光标记的非靶向PFP-NPs和CNA35靶向PFP-NPs[5]。

2.CNA35靶向PFP-NPs体外靶向性检测及体外超声分子成像观察

（1）体外靶向性检测：将人肾小管上皮HK-2细胞加入含10%胎牛血清的DMEM培养基，置于37℃、5% $CO_2$培养箱中培养。当细胞贴壁生长至80%左右时，加入浓度为5 ng/ml TGF-β诱导上皮细胞间充质转化，24 h后将细胞分为非靶向组和靶向组（每组6个复孔），然后分别将非靶向PFP-NPs和CNA35靶向PFP-NPs（$1\times10^4$个/ml）加入细胞培养液中，37℃孵育1 h，弃细胞培养液，PBS缓冲液洗涤3次，加入DAPI染色液进行细胞核染色，并于倒置荧光显微镜下观察非靶向组和靶向组细胞上PFP-NPs荧光信号（即红色区域面积）。

（2）体外超声分子成像观察：取上述1 ml CNA35靶向PFP-NPs混悬液置入凝胶模具中，低强度聚焦超声仪体外给予超声辐照（工作频率：650 kHz，焦距：125 mm，功率：0.2 W/$cm^2$，辐照时间：60 s），观察并比较辐照前后超声分子成像信号强度。

（二）DN大鼠模型建立

选择健康清洁级6~8周龄SD大鼠[北京维通利华实验动物技术有限公司，许可证号：SYXK（京）2022-0026]30只，体质量180~220 g，单笼饲养，自由饮食，12 h昼夜节律饲养。其中20只采用腹腔注射大剂量STZ（65 mg/kg）的方式制备DN大鼠模型，STZ注射前禁食、禁水12 h。注射后连续3 d采集尾静脉血检测空腹血糖，当空腹血糖均>16.7 mmol/L，且尿白蛋白>15 μg/ml视为DN大鼠模型构建成功[7]。本实验经我院动物伦理委员会批准（2022-AE182）。

（三）CNA35靶向PFP-NPs体内超声分子成像观察及体内靶向性检测

1.体内超声分子成像观察：将20只DN大鼠随机分为非靶向组和靶向组，每组各10只。使用戊巴比妥钠（30 mg/kg）麻醉大鼠，待完全麻醉，使用超声成像系统（LA523探头，频率5~9 MHz）对比脉冲序列造影模式进行超声成像，非靶向组与靶向组超声成像增益、机械指数、脉冲重复频率、扫描深度、聚焦位置等参数均相同，待图像稳定后，将30 mg/ml非靶向PFP-NPs和CNA35靶向PFP-NPs（$1\times10^6$个/ml）经大鼠尾静脉分别注入非靶向组和靶向组大鼠体内，剂量均为2 ml/kg，随即推注1 ml生理盐水冲管，注射10 min、30 min后于造影模式下观察两组大鼠肾脏，选取固定大小的感兴趣区检测超声分子成像信号强度[7]。

2.体内靶向性检测：于避光条件下处死两组中各5只DN大鼠并取出肾脏组织，制备冰冻切片，FITC标记的抗大鼠Ⅰ型胶原蛋白抗体37℃孵育1 h，PBST缓冲液洗涤后，加入DAPI染色液进行细胞核染色，并于倒置荧光显微镜下检测PFP-NPs荧光信号强度及Ⅰ型胶原荧光信号强度。

（四）肾脏组织病理学观察及Ⅰ型胶原免疫组织化学检测

将剩余的10只DN大鼠及10只健康大鼠均处死，取肾脏组织制备石蜡切片，对肾脏组织进行Masson染色，于正置显微镜下观察肾小球、肾小管的纤维化情况（蓝色区域面积，阳性组织被染成蓝色）；同时使用抗原修复液对DN大鼠肾脏组织进行抗原修复，山羊血清37℃封闭2 h，FTTC标记的兔抗大鼠Ⅰ型胶原蛋白抗体（1∶1000）4℃孵育12 h，PBST缓冲液洗涤3次，使用HRP标记二抗37℃孵育1 h，PBST缓冲液洗涤3次，使用DAB染色15 min，苏木素复染、封片，于正置显微镜下观察Ⅰ型胶原阳性（即棕黄色染色）情况，采用ImageJ软件计算Ⅰ型胶原染色面积占比，分析超声分子成像信号强度与Ⅰ型胶原染色面积占比的相关性。

三、统计学处理

应用GraphPad 8.0统计软件，计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，两组比较采用$t$检验。相关性分析采用Pearson相关分析法。$P<0.05$为差异有统计学意义。

## 结　果

一、CNA35靶向PFP-NPs体外靶向性检测及体外超声分子成像观察

本实验制备的非靶向PFP-NPs和CNA35靶向PFP-NPs平均粒径分别为(268.03±4.73)nm、(277.06±5.62)nm。体外实验结果显示,靶向组人肾小管上皮HK-2细胞上的PFP-NPs荧光信号强度高于非靶向组(388.21±15.28 vs. 25.79±3.62),差异有统计学意义($P$<0.05)。见图1。CNA35靶向PFP-NPs经体外低强度聚焦超声辐照后的超声分子成像信号显著强于辐照前。见图2。

二、CNA35靶向PFP-NPs体内超声分子成像观察

靶向组DN大鼠静脉注射CNA35靶向PFP-NPs后10 min、30 min肾脏组织超声分子成像信号强度分别为8.37±1.27、9.73±1.25,均高于非靶向组(1.92±0.25、2.08±1.32),差异均有统计学意义(均$P$<0.05);且注射后10 min超声分子成像信号强度与注射后30 min比较差异无统计学意义。见图3。

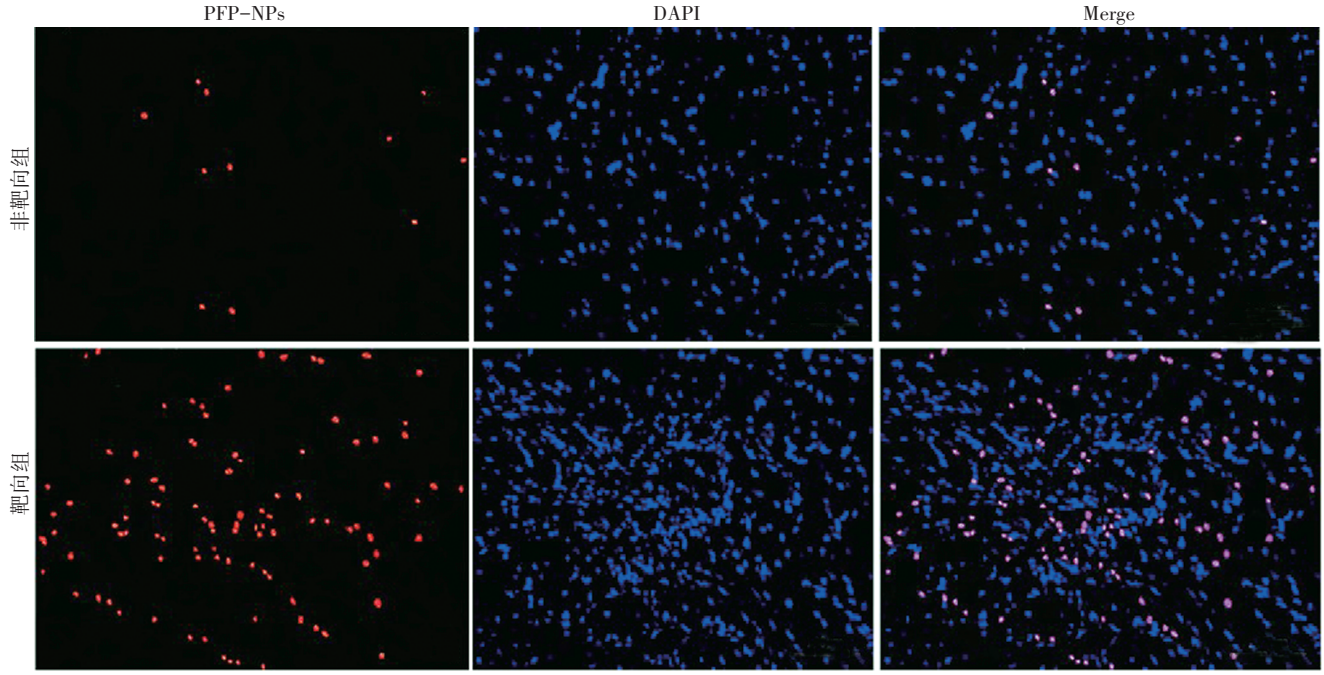



**图1**　靶向组与非靶向组人肾小管上皮HK-2细胞倒置荧光显微镜下观(标尺为100 μm)

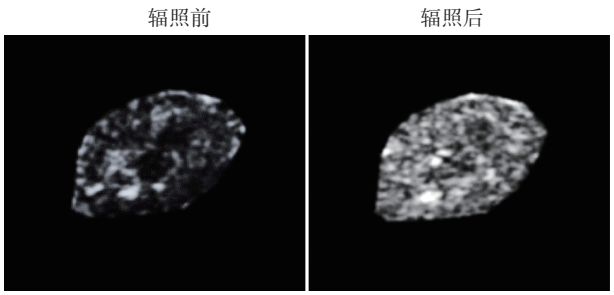



**图2**　CNA35靶向PFP-NPs体外低强度聚焦超声辐照前后超声分子成像

三、CNA35靶向PFP-NPs体内靶向性检测

肾脏组织切片荧光检测显示,靶向组DN大鼠肾脏组织PFP-NPs荧光信号强度高于非靶向组(946.02±83.55 vs. 73.69±21.72),差异有统计学意义($P$<0.05);靶向组Ⅰ型胶原荧光信号强度与非靶向组比较差异无统计学意义(969.07±96.67 vs. 943.39±106.18),且PFP-NPs荧光信号与Ⅰ型胶原荧光信号区域重合。见图4。

四、DN大鼠肾脏病理检测

Masson染色显示,DN大鼠肾脏纤维化面积大于健康大鼠肾脏(1527.69±129.66 vs. 147.81±52.36),差异有统计学意义($P$<0.05)。见图5。

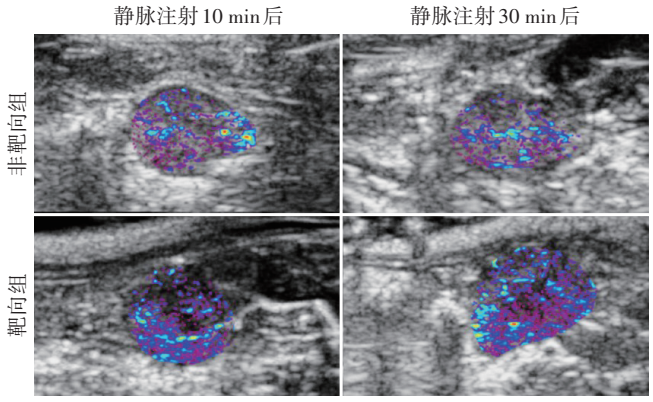



**图3**　靶向组与非靶向组静脉注射PFP-NPs后10 min、30 min体内超声分子成像

五、超声分子成像信号强度与Ⅰ型胶原染色面积占比的相关性分析

相关性分析显示,DN大鼠肾脏超声分子成像信号强度与Ⅰ型胶原染色面积占比呈正相关($r$=0.838,$P$<0.001)。见图6,7。

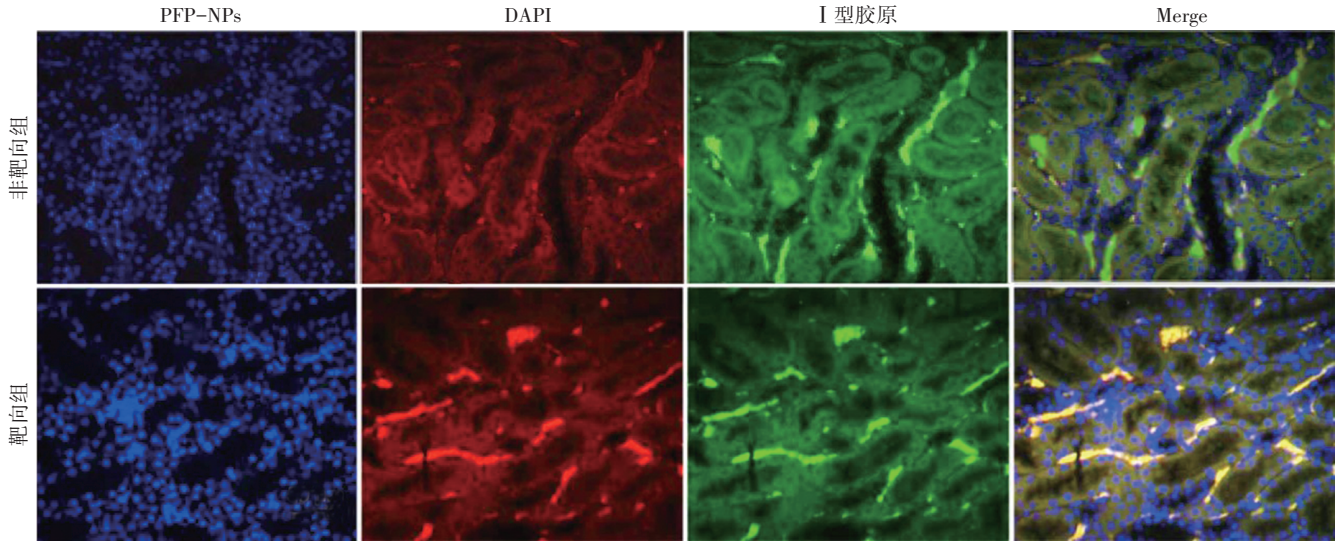
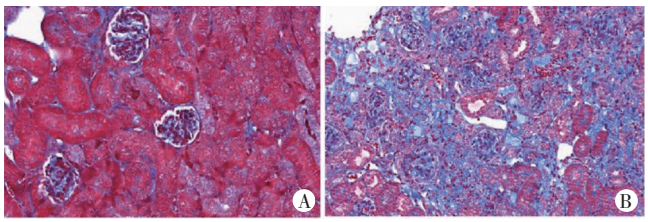



图4　靶向组DN大鼠体内靶向性检测倒置荧光显微镜下观(红色区域为PFP-NPs荧光信号;绿色区域为Ⅰ型胶原荧光信号)。标尺为50 μm




A:健康大鼠;B:DN大鼠

图5　健康大鼠和DN大鼠肾脏病理图(Masson染色,×200)




图6　DN大鼠肾脏组织Ⅰ型胶原免疫组织化学图(G:肾小球;V:肾内血管系统)

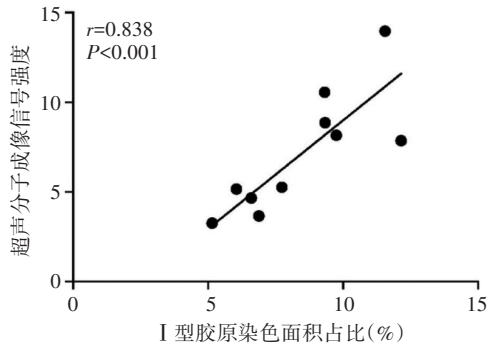



图7　DN大鼠肾脏超声分子成像信号强度与Ⅰ型胶原染色面积占比的相关性分析散点图

## 讨　论

纤维化是结缔组织在损伤反应中逐渐积累,形成不可修复性器官损伤,并进一步导致器官衰竭的一种病理变化。超声分子成像能够使细胞和亚细胞活动过程可视化,理论上选择合适的分子标记物可实现分子纤维化途径的监测及量化评估[8]。糖尿病患者持续高血糖状态会损伤肾脏,导致肾间质出现炎症细胞浸润,肾小管上皮细胞也会凋亡,而来源于肾小管上皮细胞-间充质转化的肌成纤维细胞将会聚集并使细胞外基质的生成与降解失衡,从而导致细胞外基质过度沉积,进而引发肾脏纤维化[9]。胶原沉积是DN患者肾脏纤维化的典型病理学特征。因此,通过合适的分子探针靶向胶原是DN分子诊断的重要研究方向。既往实验[10]制备了一种胶原结合蛋白CNA35,其可特异性结合纤维化组织中的胶原蛋白;且体内和体外成像实验显示,CNA35较目前可用的其他胶原蛋白可视化技术具有更高的空间分辨率。静脉注射CNA35后,可在肾脏和肝脏观察到胶原蛋白的标记,是目前应用较为广泛的纤维化分子诊断标记物。

液态氟碳是一种全氟碳化合物,稳定性高且具有携氧功能,近年来逐渐应用于超声造影剂,并取得良好的效果。液态氟碳经由磷脂壳层包裹成纳米级的颗粒后,相变阈值与其粒径呈负相关,即粒径越小,其相变阈值越高,反之则越低[11-12]。既往实验[12]指出,PFP-NPs沸点为29℃,但被脂质包裹后,在37℃环境下1 h内粒径未见明显改变。本实验成功制备Dil标记的非靶向PFP-NPs及CNA35靶向PFP-NPs,平均粒径分别为(268.03±4.73)nm、(277.06±5.62)nm。TGF-β能

够诱导人肾小管上皮HK-2细胞间质转化，导致大量胶原沉积[13]，因此发生间充质转化的上皮细胞可用于体外检测CNA35靶向PFP-NPs的靶向性。体外实验结果显示，靶向组人肾小管上皮HK-2细胞上PFP-NPs荧光信号强度高于非靶向组（388.21±15.28 vs. 25.79±3.62，$P<0.05$），表明CNA35靶向PFP-NPs能够靶向识别胶原蛋白。为了进一步探究CNA35靶向PFP-NPs对DN大鼠肾脏纤维化的诊断效果，本实验利用STZ诱导构建DN大鼠模型，结果显示DN大鼠肾脏组织有大量纤维沉积，与既往实验[14]中DN兔肾脏病理变化一致，提示成功建立了DN大鼠模型。分别给予DN大鼠注射CNA35靶向PFP-NPs和非靶向PFP-NPs，结果显示靶向组DN大鼠肾脏组织中PFP-NPs荧光信号强度高于非靶向组（$P<0.05$）。进一步对上述大鼠肾脏组织进行Ⅰ型胶原免疫荧光染色发现，PFP-NPs荧光信号与Ⅰ型胶原荧光信号区域重合，表明CNA35靶向PFP-NPs能够靶向结合DN大鼠肾脏Ⅰ型胶原纤维沉积部位。体内CNA35靶向PFP-NPs经超声辐照后，由液态转变为气态，超声分子成像信号较辐照前明显提高，表明其增强了超声分子成像效果[15]。本实验应用超声分子成像观察DN大鼠肾脏，结果显示靶向组DN大鼠肾脏组织注射CNA35靶向PFP-NPs后10 min、30 min超声分子成像信号强度分别为8.37±1.27、9.73±1.25，均高于非靶向组（1.92±0.25、2.08±1.32），差异均有统计学意义（均$P<0.05$）；且注射后10 min超声分子成像信号强度与注射后30 min比较差异无统计学意义；表明CNA35靶向PFP-NPs能够靶向结合大鼠肾脏胶原高表达部位，实现了对DN大鼠的靶向超声分子成像。在超声分子成像过程中，未与靶点结合的游离微泡会很快被消除，CNA35靶向PFP-NPs多在注射后10 min即可观察到，且持续至注射后30 min，这为今后单次造影剂注射后双侧肾脏同时成像提供了可能。肾脏纤维化是DN的基本病理表现，病理学检查是诊断DN的“金标准”，其主要根据肾脏胶原沉积评估肾脏纤维化程度[16]。本实验相关性分析显示，DN大鼠肾脏超声分子成像信号强度与Ⅰ型胶原染色面积占比呈正相关（$r=0.838$，$P<0.001$），表明超声分子成像在DN诊断中有一定价值。但CNA35靶向PFP-NPs与肾脏纤维化组织中胶原靶向结合效率仍需进一步探究。

综上所述，CNA35靶向PFP-NPs能够靶向结合大鼠肾脏胶原高表达部位，实现了对DN大鼠肾脏纤维化的靶向超声分子成像，为临床DN诊断提供了理论依据。

## 参考文献


[1] Samsu N. Diabetic nephropathy: challenges in pathogenesis, diagnosis, and treatment[J]. Biomed Res Int, 2021, 2021(1): 1497449.

[2] Tziastoudi M, Theoharides TC, Nikolaou E, et al. Key genetic components of fibrosis in diabetic nephropathy: an updated systematic review and Meta-analysis[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(23): 15331.

[3] Rabut C, Yoo S, Hurt RC, et al. Ultrasound technologies for imaging and modulating neural activity[J]. Neuron, 2020, 108(1): 93-110.

[4] 周裕卿，彭玉兰，杨林，等. 全氟化碳纳米粒在超声分子成像和治疗中的应用[J]. 中国医学影像学杂志，2022，30(5)：514-517.

[5] 李芳，钟世根，骆杰，等. 载ACE2激动剂的胶原靶向纳米粒的制备及体外显像与靶向研究[J]. 中国超声医学杂志，2021，37(8)：922-925.

[6] de Sousa Lobo Ferreira Querido R, Ji X, Lakha R, et al. Visualizing collagen fibrils in the cochlea's tectorial and basilar membranes using a fluorescently labeled collagen-binding protein fragment[J]. J Assoc Res Otolaryngol, 2023, 24(2): 147-157.

[7] 边璐. 基于SIRT1/PGC-1α信号通路探讨枸杞多糖减轻糖尿病肾病大鼠足细胞损伤的机制研究[D]. 广州：暨南大学，2020.

[8] Henderson NC, Rieder F, Wynn TA. Fibrosis: from mechanisms to medicines[J]. Nature, 2020, 587(7835): 555-566.

[9] Liang S, Wu YS, Li DY, et al. Autophagy and renal fibrosis[J]. Aging Dis, 2022, 13(3): 712-731.

[10] de Jong S, van Middendorp LB, Hermans RH, et al. Ex vivo and in vivo administration of fluorescent CNA35 specifically marks cardiac fibrosis[J]. Mol Imaging, 2014: 13. doi: 10.2310/7290.2014.00036.

[11] Eichenwald C, Dysart K, Zhang H, et al. Neonatal partial liquid ventilation for the treatment and prevention of bronchopulmonary dysplasia[J]. Neoreviews, 2020, 21(4): 238-248.

[12] 石红，杨彦辉，刘健，等. 纳米级液态氟碳靶向超声造影剂的制备及体外寻靶的实验研究[J]. 临床超声医学杂志，2017，19(5)：289-292.

[13] Wei JJ, Tang L, Chen LL, et al. Mesenchymal stem cells attenuates TGF-β1-induced EMT by increasing HGF expression in HK-2 cells[J]. Iran J Public Health, 2021, 50(5): 908-918.

[14] Zhou Q, Zeng Y, Xiong Q, et al. Construction of CNA35 collagen-targeted phase-changeable nanoagents for low-intensity focused ultrasound-triggered ultrasound molecular imaging of myocardial fibrosis in rabbits[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2019, 11(26): 23006-23017.

[15] Yao J, Yang Z, Huang L, et al. Low-intensity focused ultrasound-responsive ferrite-encapsulated nanoparticles for atherosclerotic plaque neovascularization theranostics[J]. Adv Sci (Weinh), 2021, 8(19): e2100850.

[16] Conti S, Remuzzi G, Benigni A, et al. Imaging the kidney with an unconventional scanning electron microscopy technique: analysis of the subpodocyte space in diabetic mice[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(3): 1699.


（收稿日期：2023-04-19）